

Т. В. Шаколо, О. М. Хишова

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАЛЬЦИЯ ГЛЮКОНАТА В ГЕЛЕ КАЛЬЦИЯ ГЛЮКОНАТА 2,5%**Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет**

На этапе фармацевтической разработки гелей необходимо разрабатывать и методики контроля качества, использовать новые критерии оценки эффективности, позволяющие подтвердить качество лекарственного средства, что обеспечит его надлежащую терапевтическую эффективность.

Нами разработана титриметрическая методика количественного определения кальция глюконата в геле кальция глюконата 2,5%. Методика валидирована по показателям «линейность», «правильность» и «воспроизводимость». Установлено, что стандартное отклонение среднего значения составляет 0,348%, а коэффициент корреляции – 0,9999.

Ключевые слова: кальция глюконат, гель, количественное определение.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из этапов фармацевтической разработки является оценка качества полученного лекарственного средства (ЛС), которая включает методы контроля качественного и количественного содержания активного фармацевтического ингредиента (АФИ) в ЛС. Это необходимо для установления критериев оценки эффективности с целью обеспечения надлежащего терапевтического эффекта ЛС.

Актуальной проблемой в современном здравоохранении является разработка методов лечения профессиональных заболеваний и патологий кожи, развитие которых обусловлено различными факторами окружающей среды и условиями трудового процесса.

Факторами, оказывающими неблагоприятное воздействие на кожные покровы в производственных условиях, являются органические растворители, минеральные кислоты и щелочи, соли тяжелых металлов, полимерные материалы, горюче-смазочные материалы, технические жидкости [1].

На сегодняшний день известен ряд токсикантов, вызывающих поражения кожных покровов. Эти поражения характеризуются возникновением травм, ожогов, которые способствуют развитию дефектов кожи и снижению ее резистентности к воспалительным заболеваниям и воздействию внешних факторов окружающей среды.

Кожное всасывание агрессивных соединений, приводящее к системному токсическому действию, является весьма опасным [1, 2].

При воздействии органических и неорганических веществ на организм необходимо их быстрое удаление с поверхности кожи, нейтрализация воздействия, максимально надежная защита.

На фармацевтическом рынке Республики Беларусь в настоящее время имеются косметические средства для защиты кожи рук в быту, а профессиональные дерматопротекторы для незащищенных участков кожи отсутствуют вовсе. Поэтому фармацевтическая разработка составов, технологии получения и методов стандартизации профессиональных дерматопротекторных мягких лекарственных средств для местного действия является актуальной задачей [1, 2].

Нами разработан гель кальция глюконата 2,5%, являющийся дермапротекторным средством, защищающим кожу от воздействия плавиковой кислоты.

Целью настоящей работы является валидация разработанной методики количественного определения кальция глюконата в геле кальция глюконата 2,5%.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явился гель кальция глюконата 2,5% на эмульсионной основе, содержащей в качестве гелеобразователей макроголы.

Для количественного определения кальция глюконата в геле применяли комплексонометрическое титрование.

Методика. 1,000 геля кальция глюконата 2,5% помещали в колбу для титрования, добавляли 10 мл воды очищенной.

Содержимое колбы нагревали в течение 10 мин на водяной бане, периодически взбалтывая, затем охлаждали. Фильтровали через фильтр «белая лента» в мерную колбу вместимостью 25 мл, промывали фильтр водой очищенной. Доводили объем до метки тем же растворителем и перемешивали. К 10,0 мл полученного раствора добавляли 5 мл аммиачного буферного раствора с pH 10, 0,3 г индикатора кислотного хрома черного (раствор приобретает темно-фиолетовый цвет) и титровали при энергичном помешивании 0,05 М раствором натрия эдетата до темно-синего окрашивания.

Содержание кальция глюконата в растворе в граммах рассчитывали по формуле (1):

$$m = (C \times V \times M) / 1000, \quad (1)$$

где: m – содержание кальция глюконата в растворе (в граммах),

C – концентрация титранта (моль/литр);

V – объем титранта, расходуемый на титрование (в мл);

M – молярная масса определяемого вещества (моль) [3, 4].

Валидацию методики количественного определения кальция глюконата в геле кальция глюконата 2,5% проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Республики Беларусь [5].

Для определения линейности методики испытания в пределах диапазона применения (80%–120% от номинального содержания) проводили испытание 5 образцов, приготовленных с количественной точностью для концентраций кальция глюконата 20,0 мг/г; 25,0 мг/г; 30,0 мг/г; 45,0 мг/г; 60,0 мг/г, с использованием 6 воспроизведений для каждого образца геля кальция глюконата 2,5% [3, 6]. Линейность методики количественного определения устанавливали с использованием метода наименьших квадратов по экспериментально измеренным значениям y для заданных значений аргумента x . Критерий приемлемости: коэффициент корреляции линейной зависимости должен быть не менее 0,99.

Для подтверждения сходимости анализировали последовательно шесть образцов одной серии геля кальция глюконата 2,5% в соответствии со следующим критерием приемлемости: относительное стан-

дартное отклонение среднего значения ($RSD_x, \%$), рассчитанное для содержания кальция глюконата, полученное в условиях повторяемости, не должно превышать 2,0 % [4, 6].

Правильность методики испытания по определению количественного содержания кальция глюконата определяли на моделируемых образцах с точно известным количеством кальция глюконата для трех концентраций, входящих в диапазон применения методики испытания: 24,75 мг/г; 25,0 мг/г; 25,5 мг/г (90%; 100% и 120%) с использованием 6 воспроизведений для каждой концентрации. Правильность полученных данных подтверждали путем вычисления смещения $|x_{cp} - \mu|$ и проверки значимости отличия случайной величины x_{cp} от константы μ (принятого эталонного значения) [4, 6]. Различие является незначимым (полученные результаты определения неотягощены систематической ошибкой) при выполнении неравенства (2):

$$\frac{|x_{cp} - \mu|}{S} \leq \frac{t(P, \nu) S}{\sqrt{n}} \quad (2)$$

где μ – принятое эталонное значение определяемого компонента. В проводимых испытаниях $\mu = C$ (заданное содержание определяемых веществ в пробе);

$t(P, \nu)$ – табличное значение критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для количественного определения кальция глюконата в геле кальция глюконата 2,5% применяли титриметрическую методику, так как она позволяет определить кальций глюконат в низкой концентрации. По физико-химическим свойствам гель кальция глюконата представляет собой непрозрачную вязкую массу белого цвета, что затрудняет рефрактометрическое определение количественного содержания кальция глюконата. Результаты количественного определения кальция глюконата в геле кальция глюконата 2,5% методом комплексометрического титрования представлены в таблице 1.

При статистической обработке линейной зависимости полученных значе-

Таблица 1. – Результаты количественного определения кальция глюконата в геле

№ п/п	Количество определений	Номинальное содержание, мг/г	Содержание кальция глюконата в образце, мг/г
1	6	25,0	24,84
2		25,0	24,98
3		25,0	25,03
4		25,0	25,12
5		25,0	25,26
6		25,0	25,30

ний содержания кальция глюконата от заданного содержания по уравнению типа $y = b + ax$ коэффициент корреляции составил 0,9999. Результаты оценки соблюдения линейности методики количественного определения кальция глюконата в геле кальция глюконата 2,5% представлены на рисунке 1 и в таблице 2.

Сходимость методики количественного определения кальция глюконата в МЛС подтверждена соответствующими испытаниями опытной серии геля кальция глюконата 2,5% (таблица 3). Относитель-

ное стандартное отклонение среднего значения (RSD_x , %) для содержания кальция глюконата в геле кальция глюконата 2,5%, рассчитанное в условиях повторяемости методики, составило 0,348 %, что не превышает 2,0 %.

Установили статистическую достоверность равенства средних результатов двух выборок в условиях внутрिलाбораторной воспроизводимости при количественном определении содержания кальция глюконата в геле кальция глюконата 2,5% (таблица 4).



Рисунок 1. – Линейная зависимость рассчитанного содержания кальция глюконата в испытуемом образце геля от номинального содержания

Таблица 2. – Результаты соблюдения линейности в диапазоне применения методики количественного определения кальция глюконата в геле кальция глюконата 2,5%

Объем выборки, n	5				
Заданная концентрация раствора, мг/г	20,0	25,0	30,0	45,0	60,0
Значение среднего содержания из 6 повторностей в испытуемом растворе, мг/г	39,89	50,01	60,35	89,97	119,21
Полученное значение $Q_n < 0,56$	0,38	0,27	0,25	0,46	0,24
Коэффициент корреляции	0,9999				
Тангенс угла наклона прямой (наклон), a	1,0017				
Точка пересечения с осью ординат, b	0,0833				

Таблица 3. – Результаты количественного определения кальция глюконата в геле кальция глюконата 2,5% (подтверждение сходимости)

Объем выборки, n	6					
Номинальное содержание, мг/г	25,0					
Найденные значения, мг/г	24,84	24,98	25,03	25,12	25,26	25,30
Среднее значение, мг/г	25,09					
Стандартное отклонение	0,1744					
Относительное стандартное отклонение (RSD = $S \cdot 100$), %	0,348					
Полуширина доверительного интервала	0,183					
Коэффициент Стьюдента (0,05; n - 1)	2,57					

Таблица 4. – Результаты количественного определения кальция глюконата (подтверждение внутрилабораторной воспроизводимости)

	Найдено, мг/г			Среднее значение, мг/г	Дисперсия S^2
Определение I	24,92	24,96	25,15	25,01	0,01510
Определение II	24,88	24,98	25,11	24,99	0,00887
Коэффициент Фишера F (P, f_1, f_2)	$F = S_1^2 / S_2^2 = 1,702 < F_{\text{табл}}(0,95; 5; 5) = 5,05$				
S_p	0,0078				
t (P, f)	$0,289 < t(0,95; 4) = 2,78$				

Правильность методики количественного определения выражает степень близости между значением, которое принято как стандартное, и рассчитанным значением. Результаты подтверждения правильности методики количественного определения кальция глюконата в геле

кальция глюконата 2,5% представлены в таблице 5.

Из таблицы 5 следует, что смещение результата измерения не превышает значения критерия Стьюдента $t(P, v) = t(95\%, 5) = 2,57$. Средний процент восстановления для кальция глюконата составляет 99,64%.

Таблица 5. – Результаты количественного определения кальция глюконата в модельных смесях (подтверждение правильности)

Количество кальция глюконата от номинального содержания, %	№ опр.	Номинальное содержание кальция глюконата в пробе, мг/г	Найденное содержание кальция глюконата в пробе, мг/г	Процент восстановления, %
90	1	24,75	24,67	98,81
	2		24,71	99,41
	3		24,74	99,85
	4		24,75	100,00
	5		24,77	100,30
	6		24,79	100,59
Среднее значение; мг/г			25,74	
Стандартное отклонение			0,0431	
Относительное стандартное отклонение (RSD = S·100), %			0,64	
$\frac{ x_{\varphi} - \mu \sqrt{n}}{S} \leq t(P, \nu)$			0,66 < 2,57	

Продолжение таблицы 5.

100	1	25,00	24,35	98,00
	2		24,44	99,20
	3		24,47	99,60
	4		25,0	100,00
	5		25,13	100,13
	6		25,07	100,67
Среднее значение; мг/г			24,47	
Стандартное отклонение			0,0696	
Относительное стандартное отклонение (RSD = S·100), %			0,9317	
$\frac{ x_{\varphi} - \mu \sqrt{n}}{S} \leq t(P, \nu)$			1,06 < 2,57	
120	1	25,50	25,12	98,42
	2		25,15	98,79
	3		25,19	99,27
	4		25,23	99,64
	5		25,56	100,12
	6		25,31	100,73
Среднее значение; мг/г			25,21	
Стандартное отклонение			0,0703	
Относительное стандартное отклонение (RSD = S·100), %			0,856	
$\frac{ x_{\varphi} - \mu \sqrt{n}}{S} \leq t(P, \nu)$			1,45 < 2,57	
Средний процент восстановления при 18 измерениях, %			99,64	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что титриметрическая методика количественного определения кальция глюконата позволяет с высокой точностью и с минимальными затратами определить содержание кальция глюконата в геле кальция глюконата 2,5%.

2. Подтверждены такие валидационные характеристики, как линейность и диапазон применения, правильность, воспроизводимость, что позволяет сделать вывод о валидности разработанной методики.

3. Доказано, что при количественном определении содержания кальция глюконата в геле кальция глюконата 2,5% в условиях внутрилабораторной воспроизводимости равенство средних результатов двух выборок является статистически достоверным.

4. Рассчитанное относительное стандартное отклонение среднего значения (rsd_x , %) для содержания кальция глюконата в исследуемом геле кальция глюконата

2,5% в условиях повторяемости методики, не превышает 2,0%.

5. Значение коэффициента корреляции между полученными значениями содержания кальция глюконата и заданным содержанием 0,9999 свидетельствует о приемлемости разработанной методики для количественного определения содержания кальция глюконата в геле кальция глюконата 2,5%.

SUMMARY

T. V. Shakolo, O. M. Khishova
QUANTITATIVE DETERMINATION
OF CALCIUM GLUCONATE IN
DERMATOLOGICAL GEL

At the stage of pharmaceutical development of gels, is necessary to developed quality control methods, use new criteria for evaluating the effectiveness, allowing to confirm the quality of the drug, which will ensure it's proper therapeutic efficacy.

The titrimetric method has been developed for the quantitative determination of

calcium gluconate in the gel of calcium gluconate 2.5%. The method was validated by linearity, accuracy and reproducibility. It was established that the standard deviation of the mean value is 0.348%, and the correlation coefficient is 0,9999.

Keywords: calcium gluconate, gel, quantitative determination

ЛИТЕРАТУРА

1. Мягкие лекарственные формы: учебно-методическое пособие / В. Ф. Дзюба [и др.] под ред. В. Ф. Дзюбы. – Воронеж : Изд-во ВГУ 2015. – 108 с.

2. Николаев, Н. П. Технология мазей / Н. П. Николаев. – Москва: МОРИОН, 1998. – С. 250–261.

3. Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ РБ II). В 2 т. – Т.2. Контроль качества субстанций для фармацевтического использования и лекарственного растительного сырья / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под общ. ред. С. И. Марченко. – Молодечно: тип. «Победа», 2016. – С. 49.

4. Сливкин, А. И. Контроль качества экстермпоральных лекарственных форм / А. И. Сливкин [и др.] под ред. А. И. Сливкина. – Воронеж: Изд-во ВГУ 2003. – С. 21–28, 46.

5. Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ РБ II). В 2 т. – Т. 1. Общие методы контроля лекарственных средств / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под общ. ред. А. А. Шерякова. – Молодечно: Тип. «Победа», 2012. – 1220 с.

6. Валидация аналитических методов / А. П. Арзамасцев [и др.] // Фармация. – 2006. – № 4. – С. 8–12.

Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
УО «Витебский государственный ордена
Дружбы народов медицинский университет»,
кафедра промышленной технологии
с курсом ФПК и ПК,
тел.: 8 0212 64 81 36,
Шаколо Т.В.

Поступила 24.09.2018 г.